

액와림프절 전이가 없는 유방암에서
c-erbB-2단백과 p53변이단백
발현의 의의

연세대학교 대학원
의 학 과
고 승 상

액와림프절 전이가 없는 유방암에서
c-erbB-2단백과 p53변이단백
발현의 의의

지도 박 병 우 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2004 년 6 월 일

연세대학교 대학원
의 학 과
고 승 상

고승상의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 박 병 우 인

심사위원 양 우 익 인

심사위원 서 창 옥 인

연세대학교 대학원

2004 년 6 월 일

감사의 글

미흡한 이 논문을 완성하기까지 많은 지도 편달을 해 주신 박병우 선생님께 진심으로 감사드리며, 자문과 심사 진행과정에서 많은 도움을 주신 양우익 선생님과 서창욱 선생님께 감사드립니다. 그리고 조직배열 슬라이드 제작과 판독을 위해 많은 시간을 할애하여 도와 주신 전이경 선생님, 박지영 선생님께 각별한 감사를 드립니다. 바쁜 병원 일과 중에서도 저에게 항상 관심을 기울여 주신 이지현 선생님께도 감사드립니다.

항상 묵묵히 저를 믿고 지켜봐 주신 존경하는 아버님과 장인어른께 감사드리며, 많은 걱정을 하셨음에도 불구하고 언제나 용기를 주셨던 사랑하는 어머님과 장모님께 감사드립니다. 특히 자신을 희생하며 늘 옆에서 깊은 이해와 신뢰, 그리고 애정으로 여러 가지 어려움을 함께 해준 사랑하는 아내에게 감사드립니다.

아울러 주위에서 끊임없는 관심을 보여주신 모든 분들에게 감사드립니다.

저자 씬

차 례

그림 및 표 차례	1
국문요약	2
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	7
1. 대상	7
2. 방법	7
3. 조직배열슬라이드	8
4. 면역조직화학염색	9
5. 통계	10
III. 결과	12
1. 대상 환자들의 임상적 특성	12
2. 발현율과 상관관계	15
3. 생존율 분석	17
4. 다변량 분석	17
IV. 고찰	21
V. 결론	25
참고문헌	26
영문요약	39

그림 차례

그림 1. Immunohistochemical stain status of tissue microarrays	11
그림 2. Disease-specific survival curve according to postoperative adjuvant treatment modalities	14
그림 3. Overall survival curve according to histologic grade	19
그림 4. Overall survival curve according to nuclear grade	20

표 차례

표 1. List of primary antibodies for immunohistochemical stain	9
표 2. Clinicopathologic features of cases	13
표 3. Relationship between results of immunohistochemical stain and other clinicopathologic parameters	16
표 4. Ten-year survival rate according to clinicopathologic and immunohistologic parameters	18

국문요약

액와림프절 음성 유방암에서 c-erbB-2 단백질과 p53 변이 단백질 발현의 의의

배경:

일반적으로 액와림프절 전이가 많을수록 예후는 나쁘지만, 액와림프절 전이가 있는 군에서 좋은 예후를 가지는 경우가 있으며, 반대로 액와림프절 전이 음성 유방암 환자에서 25-30%정도는 암으로 인한 재발로 사망하기도 한다. c-erbB-2 단백질 및 p53 변이단백의 발현은 일반적으로 환자의 예후와 연관이 있으며 유방암 환자의 예후를 예측하는 데 도움이 될 것으로 생각되어 많은 연구들이 이루어졌다.

대상 및 방법:

1990년 1월부터 1998년 6월까지 삼성제일병원 외과에서 수술을 시행한 유방암 환자 중 수술 당시 액와림프절 전이가 없으며, 원격전이가 없는 환자 326례를 대상으로 하였다. 이미 보관되어 있는 포르말린 고정 파라핀 포매 조직을 이용하여 4 mm 직경의 조직배열 (tissue microarray) 슬라이드를 제작하여 ER, PR, c-erbB2, p53에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다.

결과:

면역반응은 ER이 326례 중 159례로 48.8%, PR은 156례로 47.9%, c-erbB-2가 132례로 40.5%, 그리고 p53이 126례로 38.7%의 양성율을 나타내었다. ER, PR, c-erbB-2, p53에 따른 질병특이생존율의 차이는 없었다. Bloom and Richardson의 변형된 등급체계로 1등급의 10년 질병특이생존율은 100.0%, 2등급은 92.6%, 그리고 3등급은 83.7%로 조직등급이 높아질수록 유의하게

낮았다.(P=0.038). 핵등급 (reverse Black method)의 경우도 1등급의 10년 질병특이생존율은 100.0%, 2등급은 92.5%, 그리고 3등급이 83.7%로 조직등급과 같은 결과를 보였다(P=0.041). ER, PR, c-erbB-2, p53에 따른 질병특이생존율의 차이는 없었다.

결론:

조직등급과 핵등급은 액와림프절 음성인 침윤성 유관암에서 가장 중요한 예후인자였다. c-erbB-2 단백 발현과 p53 변이 단백 발현 양성은 나쁜 예후인자로 판단되는 임상·병리 인자들과 상관관계가 있으나, 예후인자로서의 유의한 의미는 없었다.



핵심되는 말 : c-erbB-2 단백, p53 변이 단백, 예후인자, 조직배열 슬라이드, 질병특이생존율

액와림프절 음성 유방암에서
c-erbB-2 단백질과 p53 변이 단백질 발현의 의의

< 지도 교수 박 병 우 >

연세대학교 대학원 의학과

고 승 상

I. 서론

유방암은 서구여성에게 가장 빈발하는 악성종양이며, 최근에는 우리나라 여성에서도 가장 많이 발생하는 악성종양이다. 유방암의 치료계획을 수립하고 시행하는 데 있어서 예후의 예측은 매우 중요하다. 이러한 목적으로 예후 인자를 결정하기 위한 연구가 지속적으로 시행되었다.

유방암의 전통적인 예후 인자로는 액와림프절의 전이유무 및 개수, 종괴의 크기, 림프관 및 혈관의 침윤, 조직 유형(histologic type), 조직과 핵등급(histologic and nuclear grade), 호르몬 수용체(estrogen and progesterone receptor) 발현 여부 등이 알려져 있다.¹ 최근에는 분자생물학의 발전에 따라 호르몬 수용체(ER/PR),^{2,3} c-erbB-2 단백질,^{4,5} p53 변이 단백질,⁶ 그리고 EGFR (epidermal growth factor receptor), ras, Ki-67, cathepsin-D, BRCA,

c-myc 등이 유방암에 있어서 예후인자로서의 가치를 알아보기 위해 활발하게 연구되고 있으며, 여러 암유발유전자(oncogene)가 유방암의 발암과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.¹ 그러나 유방암에서는 이러한 예후 인자의 다양성 때문에 이를 이용한 기준이 아직까지는 명확하게 확립되어 있지 않다.

최근 들어 선별검사의 증가로 인해 종양의 크기가 작고 액와 림프절 전이가 없는 조기유방암 환자의 분포가 증가하고 있으므로, 이러한 조기유방암 환자에게 있어 정확한 예후 인자를 활용하여 고위험 환자 군을 분류하고 적응이 되는 환자에게만 보조요법을 시행하여 불필요한 보조요법에 따른 단점을 감소시킬 수 있을 것이다. McGuire 등⁷은 대부분 화학요법을 시행하지 않아도 될 유방암 환자에서 화학요법이 시행되었다는 점을 들어 예후 예측 인자의 적극적인 활용을 통한 선택적 시행을 주장하기도 하였다. 또한 최근에 알려진 예후 예측인자들과 이미 알려진 다른 임상·병리 인자들 사이에 상관관계가 있을 것으로 예측되어 많은 연구가 시행되었으나 상호 연관성이 있다는 보고와 연관성이 없다는 보고가 있어 명확한 결론은 없는 상태이다.

c-erbB-2 단백질과 p53 변이단백의 발현은 일반적으로 환자의 예후와 연관이 있으며 유방암 환자의 예후를 예측하는 데 도움이 될 것으로 생각되어 많은 연구가 이루어졌다. 그러나 우리나라에서 지금까지 시행된 대다수의 연구는 c-erbB-2 단백질 발현, p53 변이단백 발현과 이미 알려진 다른 임상·병리 예후인자들과의 상관관계만을 비교분석한 경우가 많고, p53 변이 단백질과 c-erbB-2 단백질의 발현이 전체생존율이나 무병생존율에 독립적인 예후인자로 작용하는지에 대한 장기 추적관찰 연구는 많이 이루어지지 않았다. 더욱이 이러한 연구들은 대부분 유방암이라는 대상을 광범위하게 포함시켜 연구하였고 이에 따라 많은 오차가 포함되었을 것이다.

본 연구는 액와림프절 전이 음성인 조기유방암에서 p53 변이

단백과 c-erbB-2 단백 발현여부가 기존에 알려진 유방암의 임상·병리 예후인자와 어떠한 관계를 보이는지 비교분석하고 더 나아가 생존이나 국소재발, 전신전이에 미치는 영향도 분석하여 독립적인 예후인자로서의 c-erbB-2 단백 발현과 p53 변이 단백발현의 임상적 의의를 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상

1990년 1월부터 1998년 6월까지 삼성제일병원 외과에서 수술을 시행한 유방암 환자 1169례 중 수술 당시 액와림프절 전이가 없으며, 원격전이가 없는 환자를 대상으로 하였다. 이 중 조직형이 특별한 형은 제외하고 순수한 침윤성관암(invasive ductal carcinoma)만을 포함시켰다. 면역조직화학염색을 하기 위한 파라핀 포매조직이 불충분한 경우와 추적관찰자료 등의 기타 임상 자료가 불충분한 경우를 제외한 326례를 대상으로 하였다. 전체 환자는 변형근치유방절제술이나 부분절제술을 시행하였고 전례에서 액와림프절 광청술을 시행하였다. 절제된 액와림프절의 개수는 평균 19개였다. 중간(median) 추적기간은 70개월(1-156개월)이었다.

2. 방법

대상환자의 입원과 외래기록을 검토하여 유방암 환자에 대한 기초자료와 추적관찰 자료를 확보하였다. 환자의 폐경여부, 종양의 크기, 조직 등급, 핵등급 등의 임상·병리 인자들과 수술 후 화학요법, 호르몬 치료, 방사선 치료 등의 부가적 치료 여부를 파악하였다. TNM 분류는 2002년의 American Joint Committee on Cancer(AJCC) 제 6판의 결정 기준에 따라 분류하였다. 조직 등급은 Bloom and Richardson⁸의 변형된 등급체계⁹에 따라 G1(favorable, well-differentiated, 고분화)과 G2(intermediate, moderately differentiated, 중등도 분화) 그리고 G3(unfavorable, poorly

differentiated, 저분화)으로 분류하고, 핵등급은 reverse Black 방법에 따라 1등급(고분화), 2등급(중등도 분화), 3등급(저분화)로 분류하였다. 질병특이생존율(disease-specific survival)은 사망한 환자 중에서 사망의 원인이 유방암으로 인한 것이 확인된 경우만으로 정의하여 분석하였다. 추적관찰기간은 외래 진료기록을 토대로 마지막으로 생사여부가 파악되었던 날로 계산하였으며 최근 1년간 병원 진찰 기록이 없었던 경우는 주민등록번호 파악 후 통계청, 구청, 경찰서 등과의 협조를 통해 사망여부를 확인하였다.

3. 조직배열슬라이드(Tissue Microarrays)

조직배열은 기존에 연구되어 발표된 방법^{10,11}을 사용하였다. 이미 보관되어 있는 대상 환자들의 포르말린 고정 파라핀 포매 조직을 확보한 후 헤마톡실린-에오신(H&E) 염색 슬라이드를 통해 침윤성암세포 부위를 확인하고 표시하여 공여블록(donor block)을 준비하였다. 조직배열기(Tissue arrayer, SuperBioChips Laboratories, South Korea)를 이용하여 수여블록(Recipient block)에 각각 4 mm 직경의 구멍(Hole)을 24개씩 만든 후, 그 위치에 공여블록의 병변 부위에서 각각 4 mm 직경의 암조직을 채취하여 수여블록의 구멍에 심었다. 만들어진 수여블록은 파라핀으로 포매한 후 4 μ m 두께로 박절하여 Silane 코팅 슬라이드(Muto Pure Chemicals, Japan, Cat No. 5116)에 부착하였다.

4. 면역조직화학염색(Immunohistochemical stain)

ER, PR, c-erbB2, p53에 대한 면역조직화학 염색을 시행하

였다. 위의 방법으로 제작된 조직배열 슬라이드를 xylene으로 2회 탈 파라핀화하고 100%, 95%, 80% 에탄올로 처리한 후 증류수로 흡수 시켰다. 흡수시킨 조직배열 슬라이드를 autoclave를 이용하여 구연산 버퍼 pH 6.0에 20분간 처리한 후 3% 과산화수소수로 내인성 과산화 수소의 작용을 억제시켰다. 트리스 완충용액으로 수세한 다음 일차항체(표 1)로 ER, PR, c-erbB-2, p53을 이용하여 실온에서 1시간동안 반응한 후 트리스 완충용액으로 수세하였다. 이차항체인 N-Histofine[®] (simple stain MAX PO universal immuno-peroxidase polymer)에 30분간 반응시키고 다시 트리스 완충용액으로 수세하였다. 3-amino-ethyl carbazol(AEC)로 발색한 다음 헤마톡실린으로 대조염색하고 수용성 봉입제로 봉입하여 현미경으로 관찰하였다.

면역조직화학염색의 판독은 각 슬라이드 당 일차 항체에 염색된 암세포를 전체 암세포에 대한 비율로 양성여부를 판별하였다(그림 1). 면역조직화학염색 결과는 2명의 병리의사(전이경, 박지영; 성균관대학교 의과대학 삼성제일병원)에 의하여 판독되었다. ER, PR는 핵에 명확하게 염색된 세포가 전체 종양의 10%이상일 때 양성으로 판독하였다.¹² c-erbB2는 세포막에 고르게 염색된 경우를 양성으로 판독하였다.^{13,14} p53단백은 5%이상의 종양세포의 핵에 염색이 된 경우를 양성으로 판정하여 양성군과 음성군으로 분류하였다.^{15,16}

표 1. List of primary antibodies for immunohistochemical stain

Antibody	Dilution	Source
ER*	1:150	Lab Vision, USA, Clone SP1
PR*	1:50	Novocastra, England, Clone 1A6
c-erbB-2**	1:120	DAKO, USA, Clone 6J12
p53**	1:150	DAKO, USA, Clone DO-7

ER: Estrogen receptor

PR: Progesterone receptor

* : Monoclonal antibody

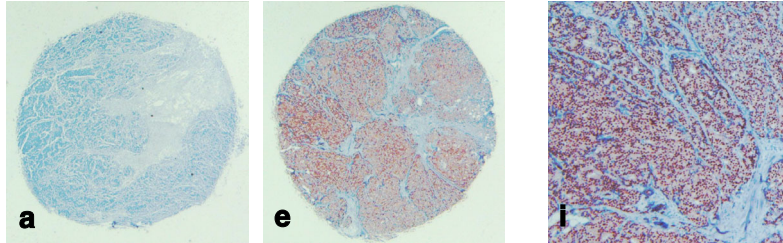
** : Polyclonal antibody

5. 통계

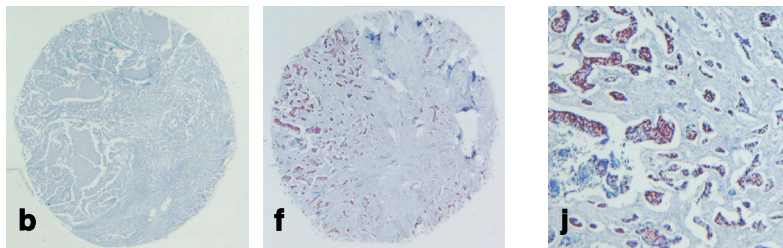
종양의 임상·병리 특성인자들 간의 상관성 비교는 교차분석 (Cross tabulation: χ^2 test / 2×2 table; Pearson)을 이용하였고, 각 인자들에 따른 생존율 단변량 분석에는 Kaplan-Meier 생존분석 (log-rank method)을 이용하였다. 사망 또는 재발에 대한 위험도의 다변량 분석은 Cox 회귀모형 (regression model)을 사용하였다. 유의성 검증은 95% 유의수준으로 P값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 하였다. 자료의 통계처리는 SPSS for windows (version 11.01; SPSS Inc., Chicago, IL)를 사용하였다.

그림 1. Immunohistochemical stain status of tissue microarrays.

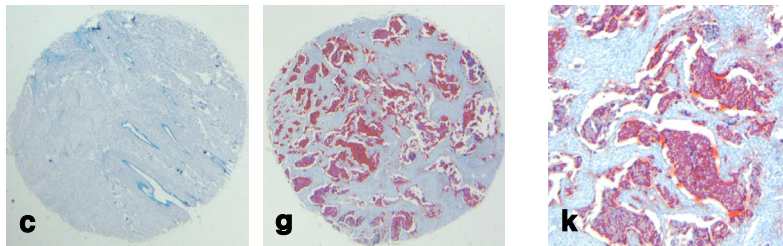
A. Estrogen receptor



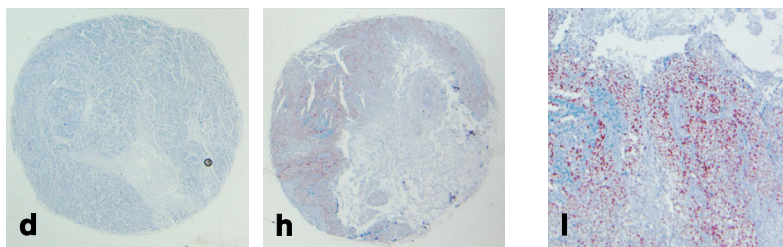
B. Progesterone receptor



C. c-erbB-2



D. p53



- Panel a-d: negative results
[original magnification $\times 12.5$]
- Panel e-l: positive results
[original magnification $\times 12.5$ (e, f, g, h), $\times 40$ (i, j, k, l)]

III. 결과

1. 대상 환자들의 임상적 특성

전체 대상의 임상·병리 예후관련 인자의 분포를 표 2에 정리하였다. 대상 환자들의 평균 연령은 48세 이었고, 폐경전 여성이 183례(56.1%)로 다소 많았다. 수술방법으로 유방보존술식을 시행한 경우는 53례(16.3%), 변형근치유방절제술을 시행한 경우는 273례(83.7%)였으며, 종양의 평균 크기는 2.3cm이었다. 조직 등급과 핵등급은 1, 2 등급에 비해 3등급이 각각 57.6%와 58.1%로 다소 많았다.

수술후 보조치료로 항암약물요법을 받은 경우는 227례(69.6%)였고 항호르몬치료(타목시펜)를 받은 경우는 195례(59.8%), 방사선치료를 받은 경우는 49례(15.0%)였고 대부분 유방보존술식을 시행한 환자들이었으며, 변형근치유방절제술 후 방사선치료를 받은 환자는 3례였다. 생존율 분석의 오차를 파악하기 위해 수술후 보조치료방법을 전신적 항암약물요법의 시행여부에 따라 크게 두 군으로 분류하여 다른 임상·병리 예후인자와 비교하였고 생존율을 비교하였다(표 2). 첫 번째 군은 수술 후 항암 약물요법을 시행하고 방사선치료나 항호르몬 치료가 추가된 경우로 하였고, 두 번째 군은 수술 후 보조 치료를 받지 않았거나 방사선 치료나 항호르몬 치료만을 받은 경우로 분류하였다. 폐경전 여성과 종괴의 크기가 클수록 항암약물요법을 시행한 경우가 많았으며($P < 0.001$), 조직등급과 핵등급이 높을수록 항암약물치료를 시행한 경우가 많았다. 치료방법에 따른 두 군 간의 질병특이생존율은 차이가 없었다(그림 2, $P = 0.300$).

환자 중 재발하지 않고 건강한 경우가 295례(90.5%), 재발하였으나 생존하고 있던 경우가 2례(0.6%), 유방암으로 인해 사망한 경우가 24례(7.4%)였고, 기타 원인으로 사망한 경우가 4례(1.2%)가

있었다.

표 2. Clinicopathologic features of cases

	Total No. of patients	Adjuvant treatment		
		CTx	no CTx	<i>P-value</i>
	326 (100.0)	227(69.6)	99(30.4)	-
Age(years)				
Mean : 48 years				
≤ 35	30 (9.2)	24(80.0)	6(20.0)	
> 35	296 (90.8)	203(68.6)	93(31.4)	<i>0.195</i>
Menopause				
Premenopause	183 (56.1)	148(80.9)	35(19.1)	
Postmenopause	143 (43.9)	79(55.2)	64(44.8)	<i><0.001</i>
Operation				
PM + ALND	53 (16.3)	28(52.8)	25(47.2)	
MRM	273 (83.7)	199(72.9)	74(27.1)	<i>0.004</i>
Tumor size(cm)				
Mean : 2.3cm				
≤ 2.0	175 (53.7)	102(58.3)	73(41.7)	
> 2.0	151 (46.3)	125(82.8)	26(17.2)	<i><0.001</i>
EIC*				
Negative	201 (61.7)	139(69.2)	62(30.8)	
Postotive	125 (38.3)	88(70.4)	37(29.6)	<i>0.812</i>
Histologic grade†				
1	19 (6.0)	10(52.6)	9(47.4)	
2	115 (36.4)	76(66.1)	39(33.9)	
3	182 (57.6)	134(73.6)	48(26.4)	<i>0.098</i>
Nuclear grade‡				
1	17 (5.4)	10(58.8)	7(41.2)	
2	114 (36.4)	75(65.8)	39(34.2)	
3	182 (58.1)	134(73.6)	48(26.4)	<i>0.211</i>

Numbers in cells : Number of case (%)

• CTx : Chemotherapy based treatment

– including chemotherapy only, CTx+endocrine therapy, CTx+radiotherapy, and CTx+endocrine+radiotherapy

• no CTx : Non-chemotherapy based

– including no further treatment, endocrine therapy, radiotherapy, and both

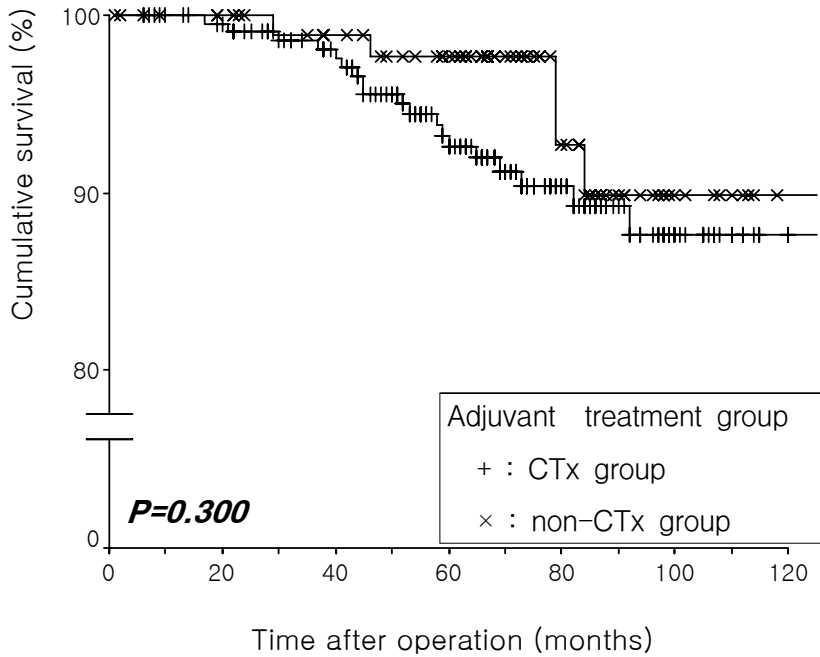
* : Extensive intraductal components

; Positive = Ductal carcinoma in Situ > 30% of total tumor mass

† : Modified Bloom & Richardson system, excluding 10 unknown case

‡ : Reverse Black method, excluding 13 unknown case

그림 2. Disease-specific survival curve according to postoperative adjuvant treatment modalities



Kaplan-Meier plot for disease-specific survival of cases with CTx group compared with non-CTx group (P=0.300).

+, × : Censored observations.

- CTx : Chemotherapy based treatment
 - including chemotherapy only, CTx+endocrine therapy, CTx+radiotherapy, and CTx+endocrine+radiotherapy
 - 10-year disease-specific survival rate ; 87.6%
- no CTx : Non-chemotherapy based
 - including no further treatment, endocrine therapy, radiotherapy, and both
 - 10-year disease-specific survival rate ; 89.0%

2. 발현율과 상관관계

면역조직화학염색 결과를 표 3에 요약하였다. 양성반응은 ER이 326례 중 159례로 48.8%, PR은 156례로 47.9%, c-erbB-2가 132례로 40.5%, 그리고 p53이 126례로 38.7%의 양성율을 나타내었다. 나이, 폐경여부와는 상관관계가 없었으나 폐경전 여성의 경우 PR 양성의 빈도가 높은 양상이었다(52.5%, $P=0.060$). 종괴의 크기가 2cm 이하인 경우 ER 양성률의 비율이 54.3%로 높았다($P=0.032$). 조직등급과 핵등급이 ER, PR, 그리고 p53과 의미있는 상관관계를 보였는데(표 3), 조직등급과 핵등급이 높을수록 ER(72.4%), PR(68.7%)은 음성이 많았고($P<0.001$), p53은 양성률이 많았다($P=0.003$). 그러나 c-erbB-2와는 상관관계를 보이지 않았다. ER, PR, c-erbB-2, 그리고 p53 상호간의 비교에서는 ER과 PR이 서로 비례관계를 보였고($P<0.001$) p53은 ER, PR과 역비례관계($P=0.002$ (ER), 0.010 (PR)), 그리고 c-erbB-2와는 비례관계($P=0.011$)를 나타냈다.

表 3. Relationship between results of immunohistochemical stain and other clinicopathologic parameters

	n	ER		PR		c-erbB-2		p53	
		positive	P value	positive	P value	positive	P value	positive	P value
	326	159(48.8)	-	156(47.9)	-	132(40.5)	-	126(38.7)	-
Age(years)									
≥ 35	30	13(43.3)		15(50.0)		11(36.7)		15(50.0)	
< 35	296	146(49.3)	0.532	141(47.6)	0.805	121(40.9)	0.654	111(37.5)	0.180
Menopause									
Premenopause	183	88(48.1)		96(52.5)		67(36.6)		71(38.8)	
Postmenopause	143	71(49.7)	0.779	60(42.0)	0.060	65(45.5)	0.107	55(38.5)	0.951
Tumor size(cm)									
≤ 2.0	175	95(54.3)		86(49.1)		68(38.9)		70(40.0)	
> 2.0	151	64(42.4)	0.032	70(46.4)	0.616	64(42.4)	0.518	56(37.1)	0.590
Histologic grade*									
1	19	15(78.9)		12(63.2)		6(31.6)		5(26.3)	
2	115	82(71.3)		80(69.6)		46(40.0)		34(29.6)	
3	182	60(33.0)	<0.001	62(34.1)	<0.001	74(40.7)	0.743	83(45.6)	0.011
Nuclear grade†									
1	17	14(82.4)		11(64.7)		6(35.3)		4(23.5)	
2	114	81(71.1)		79(69.3)		46(40.4)		34(29.8)	
3	182	60(33.3)	<0.001	62(34.1)	<0.001	74(40.7)	0.864	83(45.6)	0.003
ER									
-	167	-		26(15.6)		72(43.1)		78(46.7)	
+	159	-	-	130(81.8)	<0.001	60(37.7)	0.323	48(30.2)	0.002
PR									
-	170	29(17.1)		-		75(44.1)		77(45.3)	
+	156	130(83.3)	<0.001	-	-	57(36.5)	0.164	49(31.4)	0.010
c-erbB-2									
-	194	99(51.0)		99(51.0)		-		64(33.0)	
+	132	60(45.5)	0.323	57(43.2)	0.164	-	-	62(47.0)	0.011
p53									
-	200	111(55.5)		107(53.5)		70(35.0)		-	
+	126	48(38.1)	0.002	49(38.9)	0.010	62(49.2)	0.011	-	-

Numbers in cells : Number of case (%)

n : Total number of patients

P value : chi-square test (2×2 Pearson; except histologic and nuclear grade)

* : excluding 10 unknown cases

† : excluding 13 unknown cases

3. 생존율 분석

임상·병리 인자들에 따른 질병특이생존율은 표 4에 나타내었다. 환자의 나이, 폐경 유무는 생존율에 영향을 미치지 않았다. 종괴의 크기가 클수록 질병특이생존율이 낮은 경향을 보였으나 통계학적으로 의미는 미약하였다($P=0.084$). 조직 1등급의 10년 질병특이생존율은 100.0%, 2등급은 92.6%, 그리고 3등급은 83.7%로 조직등급이 높아질수록 유의하게 낮았다.(그림 3, $P=0.038$). 핵등급의 경우도 1등급의 10년 질병특이생존율은 100.0%, 2등급은 92.5%, 그리고 3등급이 83.7%로 조직등급과 같은 결과를 보였다(그림 4, $P=0.041$). ER, PR, c-erbB-2, p53에 따른 생존율의 차이는 없었다.

4. 다변량 분석

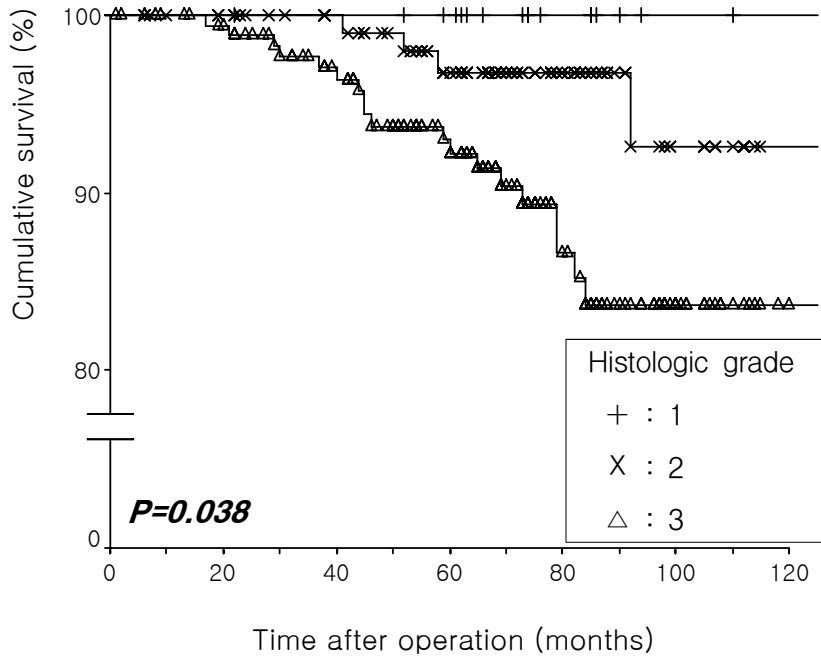
단변량 생존율 분석에서 유의한 차이를 보였던 조직등급과 핵등급을 가지고 질병 사망에 대한 다변량분석을 실시하였다. 조직등급과 핵등급은 똑 같은 분포를 보여 두 변수간에 예후인자로서 의미의 차이는 없었다.

Ⅵ 4. Ten-year disease-specific survival rate according to clinicopathologic and immunohistologic parameters

	10-year Disease specific survival	
	Percent	<i>P value</i>
Age(years)		
≤ 35	82.5	
> 35	88.8	<i>0.153</i>
Menopause		
Premenopause	88.8	
Postmenopause	87.2	<i>0.806</i>
Tumor size(cm)		
≤ 2.0	91.2	
> 2.0	85.2	<i>0.084</i>
Histologic grade		
1	100.0	
2	92.6	
3	83.7	<i>0.038</i>
Nuclear grade		
1	100.0	
2	92.5	
3	83.7	<i>0.041</i>
ER		
-	87.6	
+	89.3	<i>0.587</i>
PR		
-	90.6	
+	84.9	<i>0.360</i>
c-erbB-2		
-	89.8	
+	82.9	<i>0.422</i>
p53		
-	89.1	
+	86.5	<i>0.679</i>

P value : Kaplan-Meier method, log-rank test

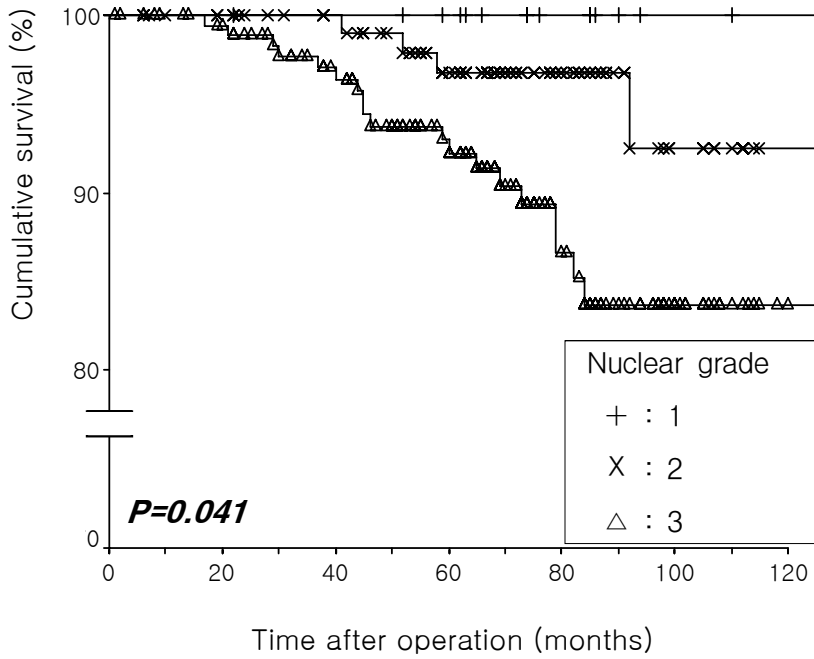
그림 3. Disease-specific survival curve according to histologic grade



Kaplan-Meier plot for disease-specific survival of cases according to histologic grade ($P=0.038$).

+, X, Δ : Censored observations.

그림 4. Disease-specific survival curve according to nuclear grade



Kaplan-Meier plot for disease-specific survival of cases according to nuclear grade ($P=0.041$).

+, X, Δ: Censored observations.

IV. 고찰

유방암은 생물적 성질뿐만 아니라 치료의 방법 역시 다양하고, 질병의 진행도 매우 장기적이다. 유방암 환자는 경우에 따라 수술 후 20년이 지나서도 전신적 재발로 인해 사망할 수 있기 때문에 매우 장기적인 추적관찰이 필요하다.¹⁷ 그러므로 유방암에 대한 예후인자로서 앞서 기술한 다양한 생물적 인자들의 의의를 알아내는 것은 매우 어려운 일이다.

유방암에서 수술 후 보조요법 결정에 가장 중요한 역할을 하는 것은 액와림프절 전이 유무와 호르몬 수용체 발현 여부이다. 일반적으로 액와림프절 전이가 많을수록 예후는 나쁘지만, 액와림프절 전이가 있는 군에서 좋은 예후를 가지는 경우도 있으며, 반대로 액와림프절 전이 음성 유방암 환자에서 25-30%정도는 암으로 인한 재발로 사망하기도 한다.^{18,19} 액와림프절 음성 유방암 환자군에서는 원발종괴의 크기,²⁰ 조직등급,^{21,22} 조직유형^{20,22} 등이 중요한 예후인자로 알려져 있다. 본 연구는 액와림프절 음성인 침윤성유관암 환자 326명을 대상으로 하였으며, 추적관찰기간은 최고 13년이었고 10년 전체 생존율은 88.2%였다. 조직등급 1, 등급 2, 그리고 등급 3의 10년 질병특이생존율은 각각 100.0%, 92.6%, 그리고 83.7%로 등급이 높아질수록 생존율이 낮아지는 것을 확인하였다($P=0.038$). 핵등급의 경우도 등급 1, 등급 2 그리고 등급 3의 10년 질병특이생존율이 각각 100.0%, 92.5%, 그리고 83.7%로 같은 양상의 결과를 보여($P=0.041$) 조직등급과 핵등급이 전체생존율에 있어 큰 영향을 끼친다는 기존의 연구 결과를 재확인 할 수 있었다.^{21,23,24}

종괴의 크기, 병기, 그리고 조직등급을 포함하여 Nottingham group에서 제창한 'Nottingham Prognostic Index'²⁵ 역시 대규모의 후향적, 전향적 연구들을 통해 예후인자로서의 의미가 확인되었

다.^{21,26} 본 연구에서는 유의하지 않았지만 종괴의 크기가 클수록 조직 등급과 핵등급이 높아지는 경향을 관찰할 수 있었다.

염색체 17번(17q21)에 위치한 c-erbB-2(HER-2, neu)는 185kDa의 transmembrane protein으로 c-erbB-2 단백질의 과발현이 유방암의 발생과 관련이 있다는 동물 실험결과의 보고²⁷ 이후에 c-erbB-2 단백질에 대한 많은 연구가 수행되었다. c-erbB-2 단백질이 어떻게 정상세포 혹은 암세포의 성장에 관여하는지는 아직 명확하게 규명되지 않았으나 epidermal growth factor receptor(EGFR)와 intrinsic tyrosine kinase activity와 관련이 있으며, EGFR과 구조적 유사성을 보이기 때문에 EGFR이 epidermal growth factor와 결합하여 세포의 증식과 분화에 작용하는 것과 유사한 기능을 하는 것으로 알려져 있다.

액와림프절 음성인 유방암에서 c-erbB-2 단백질의 과발현율은 11-44% 정도로 보고되고 있고,²⁸⁻³¹ 관상피내암(DCIS; ductal carcinoma in situ)에서는 침윤성유관암보다 발현율이 높다고 보고되고 있다.^{32,33} 본 연구에서는 변수를 줄이기 위해 조직배열 슬라이드 제작시 침윤성 암조직 부분에서만 core를 채취하였고, 발현율은 40.5%로 다소 높은 편이었으나 보고된 범위에 있었다. 많은 보고에서 c-erbB-2 단백질 발현은 나쁜 예후와 관련이 있는 ER/PR 음성, 조직 고등급 등과 상관관계가 있다고 하였으나,³⁴⁻³⁶ 반대로 어떤 상관관계도 찾을 수 없었다는 보고도 있다.³¹ 본 연구의 결과에서는 c-erbB-2 단백질 발현과 기타 다른 임상·병리 인자들과의 상관관계는 관찰할 수 없었다.

c-erbB-2 단백질의 과발현은 정상세포의 성장조절능력을 억제하여 암을 발생시키며 유방암 환자의 액와 림프절 전이, 재발률 및 생존율과 관계가 있는 나쁜 예후인자로 보고되고 있다.³⁷⁻⁴⁵ 그러나 또 다른 많은 연구 보고에서는 c-erbB-2 단백질 발현이 유방암의 재

발이나 생존율과 상관관계가 없다고 하였고,^{4,5,31,46-49} Rosen 등³¹도 이러한 관계를 볼 수 없다고 보고하였다. 본 연구에서는 c-erbB-2와 환자의 연령, 폐경유무, 종괴의 크기, 조직등급, 핵등급, 그리고 ER, PR 등의 임상·병리 인자들과의 상관관계를 관찰할 수 없었다. 그러나 c-erbB-2 단백질 발현과 다른 임상·병리 인자들과의 상관관계는 높은 핵등급,⁵⁰ ER 양성,^{32,51} 그리고 관상피내암 부분이 없는 침윤성 유방암³²에서만 찾을 수 있다는 보고가 있다. 한편 젊은 여성의 유방암에서 c-erbB-2 단백질 발현은 중요한 예후인자로 여겨지며,⁴⁰ 에스트로젠 수용체 양성인 환자의 혈청에서 c-erbB-2 단백질 발현된 경우 호르몬 치료제인 Tamoxifen에 대해 저항성이 있고 생존율도 나쁘다는 보고도 있다.⁵²

염색체 17번(17p13.1)에 위치한 암억제유전자(tumor suppressor gene)인 p53은 세포증식을 조절하는 nuclear phosphoprotein과 관련이 있다.⁵³⁻⁵⁵ 정상 p53 유전자는 암유전자에 의한 형질 전환을 억제하고 형질 전환된 세포의 성장을 억제하는 기능을 가지나 이 유전자의 부분적 소실이나 돌연변이에 의해서 생성된 mutant p53은 이와 같은 정상기능이 억제되어 악성종양을 유발한다.⁵⁴⁻⁶⁰ 또한 이 mutant p53은 wild-type p53보다 긴 반감기를 가지므로 세포 내에 축적된다.^{54,61} 환자 중 p53 변이 단백질 발현된 군은 불량한 예후를 보이는 것으로 보고되는데^{42-44,61} 그 기전은 명확하지 않으나 p53 유전자의 변이에 의해 종양의 발생이나 증식에 대한 억제기능이 상실되어 종양의 증식과 전이를 통한 임상적 진행 양상이 더 공격적이기 때문이라고 보고된다.⁶¹⁻⁶⁴

p53 변이 단백질 발현은 이미 알려진 임상·병리 예후인자들과 연관이 있을 것으로 생각되어지고 있으며, 종양의 크기, DNA ploidy, 세포의 proliferation, 호르몬 수용체, 그리고 핵분화도가 유의한 관계를 보인다는 보고가 있다.^{30,65-68} 그러나 p53 단백질 발현이

종양의 크기, 림프절 전이, 병기⁶⁹⁻⁷⁷ 그리고 호르몬 수용체^{31,42,56,76,78,79}와 유의성이 없다는 보고도 있다. 한편 다른 연구에서는 액와림프절 전이에 대해서 유의한 상관관계가 있다고 하였다.^{42-44,68,77}

본 연구에서는 전체 326례 중 126례(38.7%)에서 p53 변이 단백질 양성을 보였다. 일반적으로 유방암에서 p53 변이 단백질 발현율은 보고에 따라 다양하지만 10-60%정도이다.^{30,61,64,80,81} 면역조직화학염색시 앞서 기술한 c-erbB-2 단백질이나 p53 변이 단백질의 발현율이 연구들 간에 차이를 보이는 이유는 각 단백질의 면역조직화학 염색에 각기 다른 1차 항체가 이용되었기 때문이거나,^{82,83} 조직을 포르말린에 고정하는 시간에 따라 차이가 난다고 설명되고 있다.⁸⁴ 면역조직화학적 검색에 이용되는 일차항체로는 monoclonal antibody, polyclonal antibody 등의 종류가 있는데, Elledge 등⁸⁵의 보고에서 monoclonal antibody로써 검색한 경우는 단백질 발현이 예후를 잘 반영하였지만, polyclonal antibody로써 검색한 경우는 예후를 잘 반영하지 못하였다.

림프절 전이가 없는 유방암의 경우에도 이러한 단백질 발현이 예후가 불량함을 반영하는 독립적인 예후인자라는 연구들^{30,86-92}과 그렇지 않다는 연구들이 있다.⁹³⁻⁹⁷ 본 연구에서 p53 변이 단백질 발현은 생존율에 미치는 영향은 없었고, 환자의 나이, 폐경유무, 그리고 종양의 크기와는 상관관계가 없었으나, 높은 조직등급($P=0.011$), 높은 핵등급($P=0.011$), 호르몬 수용체 음성($P=0.002$ (ER), 0.010 (PR)), 그리고 c-erbB-2 단백질 발현 양성($P=0.011$)과 유의한 상관관계를 보였다. 이것은 이전의 보고들과 같은 결과였다.^{6,27,42,45,65,73,77,86,93,98-101}

잠재적 예후인자인 p53변이와 c-erbB-2 단백질의 발현은 서로 연관성이 있다는 보고가 있으나,⁴² 아직까지 이러한 상관관계는 명

확히 규명되지 못하고 있다.^{76,102} 특히 Rosen 등¹⁰⁰은 p53 변이 단백질과 c-erbB-2 단백질이 모두 양성인 경우 특히 매우 나쁜 예후를 보인다고 하였으나, 반대로 관계가 없다는 보고도 있다.^{79,103-105} 본 연구에서 비록 통계적 유의성은 없었으나 c-erbB-2 단백질과 p53 변이 단백질의 발현은 유방암의 예후에 영향을 준다고 알려져 있는 인자들과 상관관계를 보였으며, 이는 예후인자로서의 잠재적 의미를 가진다고 판단된다. 수술 후 보조요법에 적용할 수 있는 기준을 마련하기 위해서는 c-erbB-2 및 p53 변이 단백질 발현에 대한 장기 생존율을 포함한 보다 많은 연구가 이루어져야 하겠다.

V. 결론

조직등급과 핵등급은 액와림프절 음성인 침윤성 유관암에서 가장 중요한 예후인자이다. c-erbB-2 단백질 발현과 p53 변이 단백질 발현 양성은 나쁜 예후인자로 판단되는 임상·병리 인자들과 상관관계가 있으나, 예후인자로서의 유의한 의미는 없었다.

참고문헌

1. Harris JR, Marc E. Lippman, Monica Morrow, C. Kent Osborne. Diseases of the Breast. 2nd ed. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins: 2000.
2. Lethaby AE, Mason BH, Harvey VJ, Holdaway IM. Survival of women with node negative breast cancer in the Auckland region. *N Z Med J* 1996;109:330-3.
3. Pertschuk LP, Feldman JG, Eisenberg KB, Carter AC, Thelmo WL, Cruz WP, et al. Immunocytochemical detection of progesterone receptor in breast cancer with monoclonal antibody. Relation to biochemical assay, disease-free survival, and clinical endocrine response. *Cancer* 1988;62:342-9.
4. Quenel N, Wafflart J, Bonichon F, de Mascarel I, Trojani M, Durand M, et al. The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1995;35:283-91.
5. Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. *J Clin Oncol* 1992;10:1044-8.
6. Martinazzi M, Crivelli F, Zampatti C, Martinazzi S. Relationship between p53 expression and other prognostic factors in human breast carcinoma. An immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* 1993;100:213-7.
7. Mcguire WL. Adjuvant therapy of node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1989;320:525-7.
8. Bloom HJG. Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957;11:359-73.
9. Elston CW, Ellis IO. Pathologic prognostic factors. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19:403-10.

10. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Brlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of hundreds of specimens. *Nat Med* 1998;4:844-7.
11. Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *Int J Cancer*. 2001;94(1):1-5.
12. Pertschuk LP, Feldman JG, Kim YD, Braithwaite L, Schneider F, Braverman AS, et al. Estrogen receptor immunocytochemistry in paraffin embedded tissues with ER1D5 predicts breast cancer endocrine response more accurately than H222Sp gamma in frozen sections or cytosol-based ligand-binding assays. *Cancer* 1996;77:2514-9.
13. De Potter CR, Quatacker J, Maertens G, Van Daele S, Pauwels C, Verhofstede C, et al. The subcellular localization of the neu protein in human normal and neoplastic cells. *Int J Cancer* 1989;44:969-74.
14. Styles JM, Harrison S, Gusterson BA, Dean CJ. Rat monoclonal antibodies to the external domain of the product of the C-erbB-2 proto-oncogene. *Int J Cancer* 1990;45:320-4.
15. Marchetti A, Buttitta F, Pellegrini S, Campani D, Diella F, Cecchetti D, et al. p53 mutations and histological type of invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 1993;53:4665-9.
16. Moll UM, Riou G, Levine AJ. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7262-6.
17. Adami HO. Breast cancer incidence and mortality. Aspects on aetiology, time trends and curability. *Acta Chir Scand* 1984;519(Suppl):9-14.
18. Elledge RM, McGuire WL, Osborne CK. Prognostic factor in breast cancer. *Seminar in Oncology* 1992;19:244-53.
19. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Systemic treatment of early breast carcinoma by hormonal, cytotoxic, or immunotherapy. 133 randomised

- trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1992;339:1-15.
20. Rosen PP, Groshen S, Kinne DW. Prognosis in T2N0M0 Stage I breast carcinoma: a 20-year follow-up study. *J Clin Oncol* 1991;9:1650-61.
 21. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19:403-10.
 22. Pereira H, Pinder SE, Sibbering DM, Galea MH, Elston CW, Blamey RW, et al. Pathological prognostic factors in breast cancer. IV. Should you be a typer or a grader? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma. *Histopathology* 1995;27:219-26.
 23. Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M. Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index. *Cancer* 1991;68:2142-9.
 24. Schumacher M, Schmoor C, Sauerbrei W, Schauer A, Ummenhofer L, Gatzemeier W, et al. The prognostic effect of histological tumor grade in node-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1993;25:235-45.
 25. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer [see comments]. *Breast Cancer Res Treat* 1992;22:207-19.
 26. Balslev I, Axelsson CK, Zedeler K, Rasmussen BB, Carstensen B, Mouridsen HT. The Nottingham Prognostic Index applied to 9,149 patients from the studies of the Danish Breast Cancer Cooperative Group (DBCG). *Breast Cancer Res Treat* 1994;32:281-90.
 27. Salmon DJ, Clark GM. Amplification of c-erbB-2 and aggressive human breast tumors? *Science*

- 1988;240:1795-8.
28. Albanell J, Bellmunt J, Molina R, Garcia M, Caragol I, Bermejo B, et al. Node-negative breast cancers with p53(-)/HER2-neu(-) status may identify women with very good prognosis. *Anticancer Res* 1996;16:1027-32.
 29. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Save S, Anbazhagan R, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1992;10:1049-56.
 30. Marks JR, Humphrey PA, Wu K, Berry D, Bandarenko N, Kerns BJ, Iglehart JD. Overexpression of p53 and HER-2/neu proteins as prognostic markers in early stage breast cancer. *Ann Surg* 1994;219:332-41.
 31. Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L. Immunohistochemical detection of HER2/neu in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma. A study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *Cancer* 1995;75:1320-6.
 32. Allred DC, Clark GM, Tandon AK, Molina R, Tormey DC, Osborne CK, et al. HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol* 1992;10:599-605.
 33. Gusterson BA, Machin LG, Gullick WJ, Gibbs NM, Powles TJ, Price P, et al. Immunohistochemical distribution of c-erbB-2 in infiltrating and in situ breast cancer. *Int J Cancer* 1988;42:842-5.
 34. Lovekin C, Ellis IO, Locker A, Robertson JF, Bell J, Nicholson R, et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in primary and advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1991.
 35. Paik S, Burkhard E, Lippman ME. Clinical significance of erbB2 protein overexpression. *Cancer Treat Res* 1992;61:181-91.
 36. Somerville JE, Clarke LA, Biggart JD. c-erbB-2

- overexpression and histological type of in situ and invasive breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1992;45:16–20.
37. Gullick WJ, Love SB, Wright C, Barnes DM, Gusterson B, Harris AL, et al. c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Br J Cancer* 1991;63:434–8.
 38. Horiguchi J, Iino Y, Takei H, Yokoe T, Ishida T, Morishita Y. Immunohistochemical study on the expression of c-erbB-2 oncoprotein in breast cancer. *Oncology* 1994;51:47–51.
 39. Winstanley J, Cooke T, Murray GD, Platt H, George WD, Holt S, et al. The long term prognostic significance of c-erbB-2 in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1991;63:447–50.
 40. Xing WR, Gilchrist KW, Harris CP, Samson W, Meisner LF. FISH detection of HER-2/neu oncogene amplification in early onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1996;39:203–12.
 41. Jeffrey S, Ross, Jonathan A, Flercher. The HER/neu oncogene in breast cancer: Prognostic factor, Predictive factor, and Target for therapy. *Stem Cell* 1996;16:413–28.
 42. Philippe Bertheau, Seth M, Steinberg. c-erbB-2, p53, and nm23 gene product expression in breast cancer in young women. *Hum Pathol* 1998;29:323–9.
 43. Antonella Barbati, Ermelando V. Cosmi, Angelo Sidoni, Patrizia Collini, Maria G. Porpora, et al. Value of c-erbB-2 and p53 Oncoprotein co-overexpression in human breast cancer. *Anticancer Res* 1997;17:401–6.
 44. Bebeneck M, Bar JK, Harlozinska A, Sedlaczek P. Prospective studies of p53 and c-erbB-2 expression in relation to clinicopathological parameters of human ductal breast cancer in the second stage of clinical advancement. *Anticancer Res* 1998;18:619–24.
 45. Nakopoulou LL, Alexiadou A, Theodoropoulos GE, Lazaris AC, Tzonou A, Keramopoulos A. Prognostic significance

- of the co-expression of p53 and c-erbB-2 proteins in breast cancer. *J Pathol* 1996;179(1):31-8.
46. Gasparini G, Gullick WJ, Maluta S, Palma PD, Caffo O, Leonardi E, et al. c-erbB-3 and c-erbB-2 protein expression in node-negative breast carcinoma - an immunocytochemical study. *Eur J Cancer* 1994;30A:16-22.
 47. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-12.
 48. Sjogren S, Inganas M, Lindgren A, Holmberg L, Bergh J. Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J Clin Oncol* 1998;16:462-9.
 49. Bianchi S, Paglierani M, Zampi G, Cardona G, Cataliotti L, Bonardi R, et al. Prognostic significance of c-erbB-2 expression in node negative breast cancer. *Br J Cancer* 1993;67:625-9.
 50. Paik S, Hazan R, Fisher ER, Sass RE, Fisher B, Redmond C, et al. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1990;8:103-12.
 51. Makar AP, Desmedt EJ, De Potter CR, Vanderheyden JS, Schatteman EA. Neu (C-erbB-2) oncogene in breast cancer and its possible association with the risk of distant metastases. A retrospective study and review of literature. *Acta Oncol* 1990;29:931-4.
 52. Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabiti A, et al. c-erbB-2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast without axillary lymph node metastasis. *J Clin Oncol* 1996;14(10):2702-8.
 53. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger

- AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989;244:217-21.
54. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991;351:453-6.
 55. Avila MA, Velasco JA, Cansado J, Notario V. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. *Cancer Res* 1994;54:2424-8.
 56. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989;57:1083-93.
 57. Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky AK, Moore M, Finlay C, Levine AJ. Gain of function mutations in p53. *Nat Genet* 1993;4:42-6.
 58. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*. 1986;320:84-5.
 59. Reich NC, Oren M, Levine AJ. Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53. *Mol Cell Biol*. 1983;3:2143-50.
 60. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science* 1991;254:1138-46.
 61. Walker RA, Dearing SJ, Lane DP, Varley JM. Expression of p53 protein in infiltrating and in-situ breast carcinomas. *J Pathol* 1991;165:203.
 62. Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1982;30(4):403-8.
 63. McGuire WL. Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:154-5.
 64. Davidoff AM, Herndon JE 2nd, Glover NS, Kerns BJ, Pence JC, Iglehart JD, Marks JR. Relation between p53 overexpression and established prognostic factors in

- breast cancer. *Surgery* 1991;110:259–64.
65. JJ Sirvent MT, Salvado M, Santafe S, Martinez J, Brunet T, Alvaro J. Palacios. p53 in breast cancer. Its relation to histological grade, lymph-node status, hormonal receptors, cell-proliferation fraction(ki-67) and c-erbB-2. Immunohistochemical study of 153 cases–*Histol Histopathol* 1995;10:531–9.
 66. Elledge RM, Fuqua SA, Clark GM, Pujol P, Allred DC. William L. McGuire Memorial Symposium. The role and prognostic significance of p53 gene alterations in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1993;27:95–102.
 67. Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, Maluta S, Dalla Palma P, Caffo O, Barbareschi M, Boracchi P, Marubini E, Pozza F. Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1994;12:454–66.
 68. Davidoff AM, Kerns BJ, Iglehart JD, Marks JR. Maintenance of p53 alterations throughout breast cancer progression. *Cancer Res* 1991;51:2605–10.
 69. Andersen TI, Holm R, Nesland JM, Heimdal KR, Ottestad L, Borresen AL. Prognostic significance of TP53 alterations in breast carcinoma. *Br J Cancer* 1993;68:540–8.
 70. Koutselini H, Malliri A, Field JK, Spandidos DA. p53 expression in cytologic specimens from benign and malignant breast lesions. *Anticancer Res* 1991;11:1415–9.
 71. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194:23–8.
 72. Ostrowski JL, Sawan A, Henry L, Wright C, Henry JA, Hennessy C, Lennard TJ, Angus B, Horne CH. p53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: an immunohistochemical study. *J Pathol* 1991;164:75–81.
 73. Pratap R, Shousa S. Breast carcinoma in women under the age of 50: Relationship between p53 immunostaining,

- tumor grade, and axillary lymph node status. *Breast Cancer Res Treat* 1998;49:35–9.
74. Silvestrini R, Benini E, Daidone MG, Veneroni S, Boracchi P, Cappelletti V, et al. p53 as an independent prognostic marker in lymph node–negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:965–70.
 75. Lim DH, Son KC, Park CH, Pai ST. Relationships between p53, c-erbB-2 and other prognostic factors. *J Korean Surg Soc* 1994;46:651–5.
 76. You YK, Park SM, Jung SS, Kang RS. Expression of p53 protein detected by immunohistochemical stain of breast cancers in Korea 1995;49:13–8.
 77. Jeon HB, Koo BH, Chae YS. Relation between p53 overexpression and established prognostic factors in breast cancer. *J Korean Surg Soc* 1995;48:648–60.
 78. Lee KH, Ahn SH, Kong KY, Lee MS. The differential p53 expression in breast cancer development and the correlation to proliferative index of breast cancer. *J Korean Surg Soc* 1997;52:630–41.
 79. Caleffi M, Teague MW, Jensen RA, Vnencak–Jones CL, Dupont WD, Parl FF. p53 gene mutations and steroid receptor status in breast cancer. Clinicopathologic correlations and prognostic assessment. *Cancer* 1994;73:2147–56.
 80. Porter PL, Gown AM, Kramp SG, Coltrera MD. Widespread p53 overexpression in human malignant tumors. An immunohistochemical study using methacarn–fixed, embedded tissue. *Am J Pathol* 1992;140:145–53.
 81. Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B, Staskova Z, Rejthar A, Kovarik J, Lane DP. Patterns of expression of the p53 tumour suppressor in human breast tissues and tumours in situ and in vitro. *Int J Cancer* 1990;46:839–44.
 82. Chang K, Ding I, Kern FG, Willingham MC. Immunohistochemical analysis of p53 and HER-2/neu proteins in human tumors. *J Histochem Cytochem* 1991;39:1281–7.

83. Visscher DW, Sarkar FH, Wykes S, Kothari K, Macoska J, Crissman J. Clinicopathologic significance of p53 immunostaining in adenocarcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:973-6.
84. Silvestrini R, Rao S, Benini E, Daidone MG, Pilotti S. Immunohistochemical detection of p53 in clinical breast cancers: a look at methodologic approaches [letter]. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1020.
85. Elledge RM, Clark GM, Fuqua SA, Yu YY, Allred DC. p53 protein accumulation detected by five different antibodies: relationship to prognosis and heat shock protein 70 in breast cancer. *Cancer Res* 1994;54:3752-7.
86. Beck T, Weller EE, Weikel W, Brumm C, Wilkens C, Knapstein PG. Usefulness of immunohistochemical staining for p53 in the prognosis of breast carcinomas: correlations with established prognosis parameters and with the proliferation marker, MIB-1. *Gynecol Oncol* 1995;57:96-104.
87. Borg A, Lennerstrand J, Stenmark-Askmal M, Ferno M, Brisfors A, Ohrvik A, Stal O, Killander D, Lane D, Brundell J. Prognostic significance of p53 overexpression in primary breast cancer; a novel luminometric immunoassay applicable on steroid receptor cytosols. *Br J Cancer* 1995;71:1013-7.
88. MacGrogan G, Bonichon F, de Mascarel I, Trojani M, Durand M, Avril A, Coindre JM. Prognostic value of p53 in breast invasive ductal carcinoma: an immunohistochemical study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1995;36:71-81.
89. Stenmark-Askmal M, Stal O, Sullivan S, Ferraud L, Sun XF, Carstensen J, Nordenskjold B. Cellular accumulation of p53 protein: an independent prognostic factor in stage II breast cancer. *Eur J Cancer* 1994;30A:175-80.
90. Thor AD, Moore DH II, Edgerton SM, Kawasaki ES, Reihsaus E, Lynch HT, Marcus JN, Schwartz L, Chen LC, Mayall BH, et al. Accumulation of p53 tumor suppressor

- gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:845–55.
91. Barnes DM, Dublin EA, Fisher CJ, Levison DA, Millis RR. Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma: an important new independent indicator of prognosis? *Hum Pathol* 1993;24:469–76.
 92. Gasparini G, Toi M, Verderio P, Ranieri G, Dante S, Bonoldi E, et al. Prognostic significance of p53, angiogenesis, and other conventional features in operable breast cancer: subanalysis in node-positive and node-negative patients. *Int J Oncol* 1998;12:1117–25.
 93. Reed W, Hannisdal E, Boehler PJ, Gunderson S, Host H, Nesland JM. The prognostic value of p53 and c-erbB-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma: A multivariate analysis of prognostic factors in 613 patients with a follow-up of 14~30 years. *Cancer* 2000;88:804–13.
 94. Domagala W, Striker G, Szadowska A, Dukowicz A, Harezga B, Osborn M. p53 protein and vimentin in invasive ductal NOS breast carcinoma—relationship with survival and sites of metastases. *Eur J Cancer* 1994;30A(10):1527–34.
 95. Haerslev T, Jacobsen GK. An immunohistochemical study of p53 with correlations to histopathological parameters, c-erbB-2, proliferating cell nuclear antigen, and prognosis. *Hum Pathol* 1995;26:295–301.
 96. Lipponen P, Ji H, Aaltomaa S, Syrjanen S, Syrjanen K. p53 protein expression in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Int J Cancer* 1993;55:51–6.
 97. Schimmelpenning H, Eriksson ET, Zetterberg A, Auer GU. Association of immunohistochemical p53 tumor suppressor gene protein overexpression with prognosis in highly proliferative human mammary adenocarcinomas. *World J Surg* 1994;18:827–33.
 98. Isola J, Visakorpi T, Holli K, Kallioniemi OP. Association

- of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1109-14.
99. Leonardi E, Girlando S, Serio G, Mauri FA, Perrone G, Scampini S, Dalla Palma P, Barbareschi M. PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol* 1992;45:416-9.
 100. Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L. p53 in node-negative breast carcinoma: an immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *J Clin Oncol* 1995;13:821-30.
 101. Stenmark A, Stal O, Olsen K, Nordenskjold B. p53 as a prognostic factor in Stage I breast cancer. South-East Sweden Breast Cancer Group. *Br J Cancer* 1995;72:715-9.
 102. Sa YH, Cho SH, Kim SS, Jung GJ, Kim YH, Hong SH, et al. Overexpression of p53 as a prognostic marker in breast cancer. *J Korean Surg Soc* 1998;55:645-52.
 103. Clahsen PC, van de Velde CJ, Duval C, Pallud C, Mandard AM, Delobelle DA, et al. p53 protein accumulation and response to adjuvant chemotherapy in premenopausal women with node-negative early breast cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:470-9.
 104. Jacquemier J, Moles JP, Penault L, Adelaide J, Torrente M, Viens P, et al. p53 immunohistochemical analysis in breast cancer with four monoclonal antibodies: comparison of staining and PCR-SSCP results. *Br J Cancer* 1994;69:846-52.
 105. Katoh A, Breier S, Stemmler N, Specht S, Blanock K, D'Amico F. p53 protein expression in human breast carcinoma: lack of prognostic potential for recurrence of the disease. *Anticancer Res* 1996;16:1301-4.

Abstract

The significance of c-erbB-2 and p53 expression in patients with axillary lymph node negative breast cancer

Ko, Seung Sang

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Park, Byeong Woo)

BACKGROUNDS:

Approximately 25–30% of breast cancer patients with negative axillary lymph nodes die of their disease. Biologic markers such c-erbB-2 and p53 protein have been reported to be related to tumor progression, but their prognostic value remains controversial.

METHODS:

A total of 326 axillary lymph node negative breast cancer patients from the Samsung Cheil Hospital treated between January 1990 and June 1998 were analyzed with respect to tumor size, histologic grade, and immunohistochemical staining for estrogen receptor(ER), progesterone receptor(PR), p53 and c-erbB-2. To evaluate the ER, PR, c-erbB-2 and p53 status. We constructed a tissue microarray from 326 breast tumors, with a single 4mm core per specimen.

RESULTS:

c-erbB-2 immunoreactivity was present in 132 of 326 tumors (40.5%), and p53 immunostaining was present in 126 of tumors (38.7%). One hundred and fifty nine tumors (48.8%) were positive for ER, and 156 tumors (47.9%) were positive for PR. No significant differences in disease-specific survival were found according to ER, PR, c-erbB-2, and p53 expression status. After 10 years of follow-up, the disease-specific survival rate for patients with tumors of histologic grade 1, grade 2, and grade 3 (according to Elston and Ellis' modification of the Bloom and Richardson method) were 100.0%, 92.6%, and 83.7%, respectively (P=0.038), and were 100.0%, 92.5% and 83.7%, respectively (P=0.041), for patients with tumors of nuclear grade 1, grade 2, and grade 3 (reverse Black method). The multivariate analysis selected these two variables as the best predictors of disease-specific survival.

CONCLUSIONS:

Histologic grade and nuclear grade were found to be major prognostic factors for patients with axillary lymph node negative breast cancer after 10 years of follow-up. c-erbB-2 and p53 expression does not appear to have significant independent prognostic value.

Key Words : c-erbB-2, p53, prognostic factor, tissue microarray, disease-specific survival